Rev.Acad.Canar.Cienc., IX (Núms. 2,3 y 4), 55-63 (1997)

COMPORTAMIENTO DEL EXOPOLISACARIDO ACIDO DE *BRADYRHIZOBIUM (CHAMAECYTISUS)* BGA-1 EN CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR

A.R. Díaz-Marrero[a], A.M. Gutiérrez-Navarro[b] y J.Corzo[a]

Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular[a] y de Microbiología y Biología Celular[b]. Universidad de La Laguna. La Laguna. 38071 Tenerife. España.

ABSTRACT

The molecules of the acidic polysaccharide produced by the bacterium *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 were associated when dissolved in water, but not when dissolved in KCl, Ca_2Cl or EDTA solutions. We have found no proof of divalent cation-mediated binding of the polysaccharide molecules. The polymerisation degree of the basic pentasaccharide unit was determined by chromatography in Sephacryl HR400 with lineal dextran molecules used as molecular weight standards. It ranged between 26 to 105 repeating units, being more frequent the molecules made by 43-44 pentasaccharides.

RESUMEN

En agua destilada (pero no en disoluciones de KCl, Ca_2Cl o EDTA) las moléculas del polisacárido ácido producido por la bacteria *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 se asociaron entre si. No se encontraron pruebas de que las moléculas del polisacárido se uniesen mediante enlaces iónicos con cationes divalentes. Mediante cromatografía en Sephacryl HR400 y usando patrones lineales de dextrano se determinó el grado de polimerización de la unidad pentasacarídica básica del polisacárido, que resultó estar comprendido entre 26 y 105, predominando las moléculas formadas por 43-44 repeticiones del pentasacárido.

Key Words: *Bradyrhizobium*, Exopolysaccharide, Molecular Exclusion Chromatography

Palabras clave: *Bradyrhizobium*, Exopolisacárido, Cromatografía de exclusión molecular.

1. INTRODUCCION

Entre las estirpes de bacterias fijadoras de nitrógeno que se han aislado de leguminosas endémicas de las Islas Canarias, la denominada *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 produce un exopolisacárido (EPS) ácido cuando se cultiva en medios ricos en manitol LEON-BARRIOS [5]. Este EPS está formado por glucosa, galactosa, manosa y ácido galacturónico, presentando un variable grado de acetilación y sustitución por grupos O-metilo; su estructura covalente se ha publicado recientemente [6], y ha resultado idéntica a la del EPS producido por *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, excepto en la pauta de sustitución de los monosacáridos por grupos acetilo y metilo. La unidad pentasacarídica básica tiene la siguiente estructura [6]:



→3)-[α-D-Gal*p*-(1→6)]-α-D-Glc*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*-(1→3)-α-D-Gal*p*A-(1→3)-α-D-Man*p*-(1→

Este polisacárido resulta de interés porque sus disoluciones presentan la notable propiedad de precipitar en presencia de iones metálicos tri- o polivalentes sin que, a diferencia de lo habitual en otros polisacáridos ácidos, sus disoluciones gelifiquen [1]. Esta precipitación es bastante específica y requiere que los cationes metálicos se encuentren hidrolizados en la forma general $Me(OH^-)_n^{2+}$. Además de la estructura covalente de este EPS, se conoce su comportamiento electroforético el cual parece indicar que presenta un carácter polidisperso [5]. Por otra parte, se ha propuesto [5] que el EPS puede unir iones calcio formando agregados que se disocian en presencia del agente quelante EDTA. Sin embargo, no existen datos definitivos que avalen la anterior afirmación ni tampoco sobre su comportamiento en cromatografía de exclusión molecular. Dado que esta técnica puede aportar datos tanto sobre el tamaño molecular medio, parámetro que resulta desconocido, como sobre posibles interacciones de asociación intermoleculares que no resulten en la formación de precipitados o geles, parece conveniente el estudio mediante cromatografía de exclusión molecular del EPS producido por *B.(Chamaecytisus)* BGA-1. Tal es el objeto de la presente comunicación.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Aislamiento y purificación del exopolisacárido

El polisacárido se obtuvo a partir de cultivos de 7 días de *B. (Chamaecytisus)* BGA-1 crecidos en 3 L de medio YM [9]. El medio de cultivo se centrifugó durante 20 min. a 10.000x*g*, y el sobrenadante se concentró hasta un tercio de su volumen inicial en un rotavapor a 45°C. El polisacárido se precipitó con 3 vol. de etanol, el precipitado se recogió mediante centrifugación, y seguidamente se dializó exahustivamente frente a agua desionizada y se liofilizó Para purificar el EPS ácido se disolvieron 0,5 gramos del liofilizado en 25 ml de EDTA 0,1 M, KCl 0,05 M en tampón Tris 0,1 M pH 8,0.. El residuo insoluble se eliminó por centrifugación, dializándose el sobrenadante frente a KCl 20 mM en un tampón Tris 20 mM pH 8,0. El resultado de la diálisis se aplicó a una columna (2,5 x 40 cm) de intercambio iónico de DEAE-Shephacel (Pharmacia-Biotech) equilibrada con el tampón de diálisis. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de KCl desde 20 mM hasta 300 mM en tampón Tris 20 mM pH 8,0. El flujo empleado fue de 25 ml/h siendo el volumen total del eluido de 500 ml, el cual se recogió en fracciones de 5 ml. El polisacárido se detectó por el método de DUBOIS *et al.* [2] y el gradiente salino se valoró mediante conductimetría. Las fracciones de polisacárido que formaban el pico que eluyó entre 170 y 230 mM de KCl se reunieron y se dializaron frente a agua desionizada para su posterior liofilización. Para inhibir el crecimiento de microorganismos se añadió clorhexidina (Hibitane) hasta el 0,02% a todas las disoluciones y medios de diálisis empleados, a excepción de la diálisis final.

2.2 Cromatografía de exclusión molecular

Se han empleado los siguientes medios: Ultrogel AC44 (IBF Biotechniques); es una matriz formada por partículas esféricas de poliacrilamida con un gel de agarosa intersticial [8]. Sephacryl HR200 y Sephacryl HR400 (Pharmacia-Biotech) se presentan como partículas esféricas formados por entrecruzamiento covalente de dextrano con NN′-metilen-bisacrilamida. El rango de fraccionamiento del Ultrogel AC44 y del Sephacryl HR200 es similar, estando comprendido entre 1.000 y 80.000 Dalton para dextranos. El Sephacryl HR400 presenta un rango de fraccionamiento para dex-

tranos comprendido entre 10.000 y 1.000.000 Dalton. En todos los casos el EPS se disolvió a una concentración de 1,5 mg/ml en el medio en el cual se había equilibrado previamente la columna y en el que se iba a realizar la elución. El flujo de elución se ajustó a 12,5 ml/hora y se recogieron fracciones de 1,5 ml, determinándose la concentración del polisacárido en cada una de ellas. Para determinar el volumen de exclusión de las columnas se empleó Dextran Blue (Pharmacia-Biotech); el volumen total se determinó con galactosa o dicromato potásico. El valor de Kav se determinó como:

Kav = (volumen de elución-volumen de exclusión)/(volumen total-volumen de exclusión)

Como patrones se usaron preparaciones de dextrano cuyos pesos moleculares medios fueron: 11.600; 23.800; 48.600 y 80.900 Dalton (Fluka Biochemica).

2.3 Cuantificación del exopolisacárido

La cuantificación del EPS se realizó mediante una variante del método de DUBOIS *et al* [2]. A 0,1 ml de la muestra a valorar se añadieron 0,9 ml de agua y 50 µl de fenol al 80% en agua. Las muestras se incubaron durante 30 min. a 60°C, añadiéndose seguidamente 3 ml de H_2SO_4. Las muestras se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 480 nm. Los resultados se expresan como mg de glucosa, al ser este monosacárido el patrón empleado. El grado de contaminación por proteínas o ácidos nucleicos del EPS se evaluó mediante espectroscopía de absorción entre 205 y 300 nm de longitud de onda. Se emplearon disoluciones acuosas del EPS a una concentración de 5 mg/ml.

2.4 Determinación de la viscosidad

La viscosidad de una disolución del polisacárido (concentración 0,5 mg/ml), se determinó empleando como disolvente una disolución acuosa de ácido acético, ácido fórmico y piridina a una concentración 0,05 M de cada uno cuyo pH fue ajustado a 5,17 con NaOH. La viscosidad fue determinada empleando un viscosímetro cinemático KPG-Ubbelohde de 15 ml de capacidad aproximadamente, 0,5 mm de diámetro y de constante 0,002894. Se obtuvieron valores de flujo superiores a los 300 s. por lo que no fue necesario hacer uso del factor de corrección Haggenbach-Couette. Los tiempos fueron medidos electrónicamente con una célula fotoeléctrica Shott AVS 350. Para determinar la densidad se empleó un den-

símetro A. Paar modelo DMA-60. La célula DMA-602 fue calibrada periódicamente con aire seco y agua desionizada. Todas las medidas fueron tomadas a 25°C.

3. RESULTADOS

En la Fig. 1 se muestra el efecto que la naturaleza del soporte presentó sobre el comportamiento cromatográfico del EPS. Es de destacar que el EPS se adsorbió significativamente al Sephacryl HR200, a pesar de que generalmente se considera que éste es un soporte inerte; esta adsorción no ocurrió en Ultrogel AC44, aunque en este caso se encontró que las moléculas del EPS se asociaron fuertemente entre si. Ahora bien, tanto la unión de las moléculas de EPS entre si como su adsorción al Sephacryl HR200 desaparecieron al incrementar la fuerza iónica: En la Fig. 2 se muestra el perfil de elución de los EPS en presencia de KCl 0,1 M y urea 6M. El perfil cromatográfico en ausencia de urea y en KCl 0,1 M fue similar al mostrado en la Fig. 2.

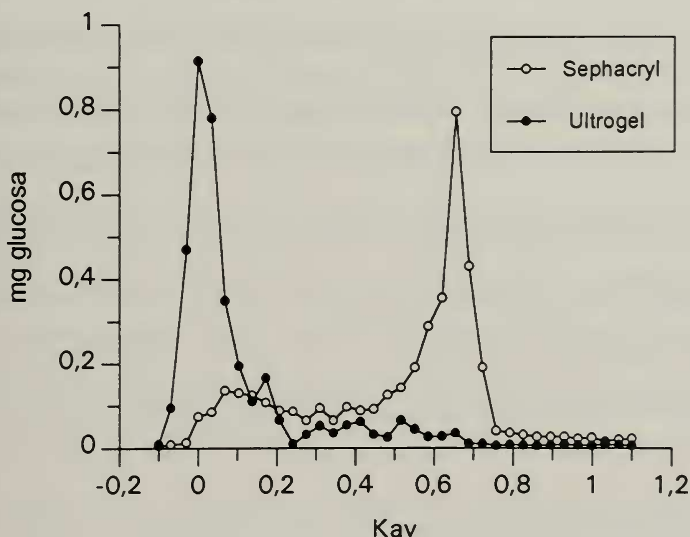


Figura 1 Perfil de elución del exopolisacárido ácido producido por *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 cromatografiado en agua desionizada. Se emplearon columnas de 45 x 2,5 cm, empaquetadas con Ultrogel AC44 o con Sephacryl HR200.

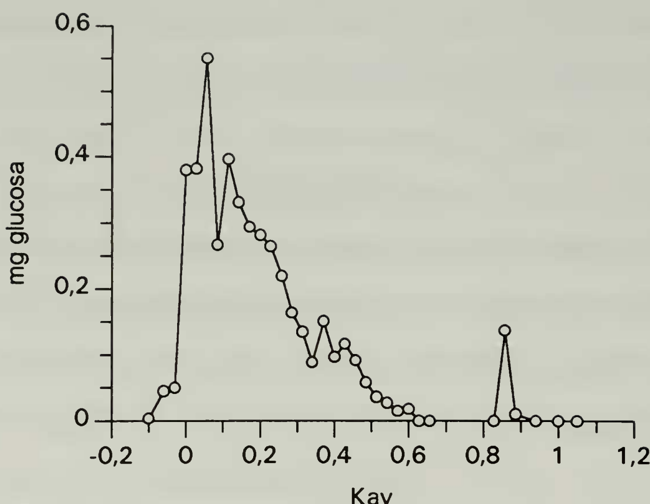


Figura 2. Perfil de elución del exopolisacárido ácido producido por *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1. Se empleó una columna de 45 x 2,5 cm empaquetada con Sephacryl HR200 eluída con urea 6 M en KCl 0,1 M.

Teniendo en cuenta el que la mayor parte del EPS eluyó cerca del volumen de exclusión tanto en las columnas de Sephacryl HR200 como en las de Ultrogel estos medios no resultaron adecuadas para la determinación de su tamaño. Por ello, se empleó para este fin una columna de 100 cm x 2,5 cm de diámetro rellena con Sephacryl HR400, capaz de separar moléculas de mayor tamaño que las matrices anteriores. Los resultados se muestran en la Fig. 3. Los EPS eluyeron como un pico ancho, como cabía esperar de su carácter polidisperso, y asimétrico. El rango de pesos moleculares relativos a los patrones de dextrano y el número de restos glucosilo en la cadena (entre paréntesis) fue de 16.000 (104) a 65.000 (422), con un máximo a 26.800 (174). Teniendo en cuenta que el dextrano es un polímero linal de glucosa, mientras que el EPS de BGA-1 está formado por *n* repeticiones de un tetrasacárido sustituído; los valores de pesos moleculares hallados sugieren que el número de repeticiones de la unidad básica varía de 26 a 105, predominando las especies con 43-44 repeticiones.

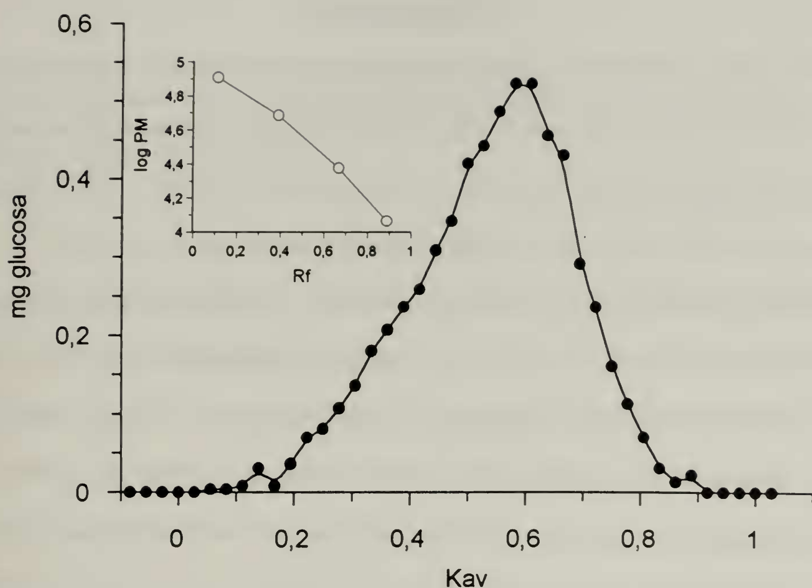


Figura 3. Perfil de elución del exopolisacárido ácido producido por *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 cromatografiado en KCl 0,1 M. Se empleó una columna de 100 x 2,5 cm empaquetada con Sephacryl HR400. En el inserto se muestra la relación entre el valor de Kav (determinados en la misma columna y condiciones que para el EPS de BGA-1) y el peso molecular medio de los patrones de dextrano empleados.

Empleando la columna de Sephacryl HR400 se estudió si los cationes divalentes Ca^{++} y Mg^{++} asocian las moléculas de EPS, como se había sugerido previamente [5]. Sin embargo, los perfiles de elución en presencia de $CaCl_2$ 0,1 M en agua (pH 5,75); de $CaCl_2$ 0,1 mM en tampón acetato potásico 20 mM pH 5,6 ; de $MgCl_2$ 10 mM en agua o de $MgCl_2$ en tampón Tris 10 mM pH 8 fueron idénticos a los mostrados en la Fig. 3.

El polisacárido (a una concentración de 0,5 mg/ml) incrementó muy ligeramente la viscosidad del solvente. Así, la viscosidad absoluta del solvente puro fue de 0,9198 cP (1,031 relativa al agua), mientras que en presencia del polisacárido aumentó hasta 0,9344 cP (1,048 de viscosidad relativa al agua). La disolución del polisacárido mostró comportamiento de tipo newtoniano.

4. DISCUSION

Los resultados obtenidos no justifican la hipótesis anterior [5] de que las moléculas de EPS se unen entre sí mediante cationes divalentes; por el contrario, muestran claramente que esa asociacion no existe. La citada hipótesis se basaba en el hecho de que, en columnas de Ultrogel AC44, eluyendo los EPS en agua se comportaban como moléculas de tamaño elevado, mientras que eluyendo en EDTA 10 mM el tamaño molecular aparente es mucho menor [5]. Sin embargo, los datos presentados muestran que esta disociación es un efecto debido a la fuerza iónica y más que al carácter quelante para cationes divalentes del EDTA. Esta unión polisacárido-polisacárido en agua ocurre también cuando se emplea Sephacryl HR200, en donde los EPS se adsorben a la matriz. Teniendo en cuenta que el Ultrogel y el Sephacryl son copolímeros de poliacrilamida y agarosa o dextrano, respectivamente, cabe suponer que los EPS en agua se unen más fuertemente al dextrano que a la agarosa por interacciones que no deben ser de carácter iónico, dado que el dextrano es un polisacárido neutro.

El tamaño estimado del EPS de *B. (Chamaecytisus)* BGA-1 es notablemente menor que el de otros polisacáridos rizobianos, cuyos pesos moleculares pueden alcanzar varios millones de Dalton [3, 4]. El valor del peso molecular hallado es meramente aproximado, ya que la los patrones empleados y el EPS tienen estructura diferente. En efecto, los dextranos son moléculas lineales formadas por restos de desoxiglucosa unidos por enlaces glicosídicos α $(1\rightarrow6)$, mientras que en la cadena central del EPS estudiado los enlaces son $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow3)$ [6]. Esto se traduce en que el EPS de BGA-1 es una molécula relativamente rígida, [7], mientras que las cadenas de dextrano resultan notablemente más flexibles. En cualquier caso, el valor del peso molecular estimado indica un grado de polimerización de la unidad pentasacarídica relativamente bajo, lo que está de acuerdo tanto con los bajos valores de viscosidad de la disolución del EPS como con el hecho de que estas disoluciones presenten un comportamiento newtoniano, a diferencia de lo que es característico de las disoluciones de polisacáridos de elevado peso molecular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes (Dirección General de Universidades e Investigación) del Gobierno de Canarias. Agradecemos al Prof. A. Vivo del Departamento de Química Física de la Universidad de La Laguna su colaboración en la determinación de la viscosidad de la disolución del polisacárido.

BIBLIOGRAFIA

[1] CORZO, J., LEON-BARRIOS, M., HERNANDO-RICO, V. y GUTIERREZ-NAVARRO, A.M. (1994), Appl. Environ. Microbiol., **60**, 4531-4536.

[2] DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, A. y SMITH, F. (1956), 28, 350-356.

[3] GONZALEZ, J.E., YORK, G.M. v WALKER, G.C. (1996), Gene, **179**, 141-146.

[4] LEIGH, J.A. y WALKER, G. C. (1994), TIBS, **10**, 63-67.

[5] LEON-BARRIOS, M., GUTIERREZ-NAVARRO, A.M., PEREZ-GALDONA, R., DIAZ-SIVERIO, J., TRUJILLO, J. Y CORZO, J. (1992), J. Appl. Bacteriol., **72**, 91-96.

[6] POVEDA, A., SANTAMARIA, M., BERNABE, M., PRIETO, A., BRUIX, M., CORZO, J. y JIMENEZ-BARBERO, J. (1997), Carbohyd. Res. **en prensa.**

[7] POVEDA, A., SANTAMARIA, M., BERNABE, M., RIVERA, A., CORZO, J. y JIMENEZ-BARBERO, J. (1997), Carbohyd. Res. **en prensa.**

[8] RYLEY, H.C. y MATTHEWS, N. (1977) Sci. Tools, **25**, 4-5.

[9] VINCENT, J.M. (1970), en: *A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria*, Blackwell Sci. Pub., Oxford.